

**TCVN**

**TIÊU CHUẨN QUỐC GIA**

**TCVN 10021:2013**

**ISO 15163:2012**

Xuất bản lần 1

**SỮA VÀ SẢN PHẨM SỮA – RENNET BÊ VÀ RENNET BÒ –  
XÁC ĐỊNH HÀM LƯỢNG CHYMOSIN VÀ PEPSIN BÒ  
BẰNG PHƯƠNG PHÁP SẮC KÝ**

*Milk and milk products – Calf rennet and adult bovine rennet –  
Determination by chromatography of chymosin and bovine pepsin contents*

**HÀ NỘI – 2013**

## Lời nói đầu

TCVN 10021:2013 hoàn toàn tương đương với ISO 15163:2012;

TCVN 10021:2013 do Ban kỹ thuật tiêu chuẩn quốc gia TCVN/TC/F12  
*Sữa và sản phẩm sữa* biên soạn, Tổng cục Tiêu chuẩn Đo lường  
Chất lượng thẩm định, Bộ Khoa học và Công nghệ công bố.

## **Sữa và sản phẩm sữa – Rennet bê và rennet bò – Xác định hàm lượng chymosin và pepsin bò bằng phương pháp sắc ký**

*Milk and milk products – Calf rennet and adult bovine rennet –*

*Determination by chromatography of chymosin and bovine pepsin contents*

### **1 Phạm vi áp dụng**

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp chuẩn để xác định hàm lượng chymosin và pepsin bò có trong mẫu thử rennet bê và rennet bò. Ngoài ra, phương pháp này có thể được dùng cho hỗn hợp của rennet bê/bò có chymosin bò được sản xuất bằng lên men (FPC).

### **2 Tài liệu viện dẫn**

Các tài liệu viện dẫn sau là rất cần thiết cho việc áp dụng tiêu chuẩn này. Đối với các tài liệu viện dẫn ghi năm công bố thì áp dụng phiên bản được nêu. Đối với các tài liệu viện dẫn không ghi năm công bố thì áp dụng phiên bản mới nhất, bao gồm cả các sửa đổi.

ISO 11815 *Milk – Determination of total milk-clotting activity of bovine rennets (Sữa – Xác định hoạt độ đông tụ sữa tổng số của rennet bò)*.

### **3 Nguyên tắc**

Bước thứ nhất, mẫu rennet được khử muối và tách các enzym chymosin và pepsin bò trên cột trao đổi anion<sup>[8],[9]</sup>. Bước thứ hai, hoạt độ đông tụ sữa của từng enzym đã tách ra được xác định bằng ISO 11815 (sữa hoàn nguyên có pH 6,5). Thành phần enzym của mẫu rennet được biểu thị bằng phần trăm hoạt độ chymosin và phần trăm hoạt độ pepsin trên tổng hoạt độ của hai thành phần tính bằng Đơn vị Đông tụ Sữa Quốc tế (IMCU), hoặc các kết quả được biểu thị bằng miligam trên lít chymosin hoạt động và miligam trên lít pepsin hoạt động.

## TCVN 10021:2013

Hoạt độ đông tụ sữa tổng số mè đầu của bột chất chuẩn đối chứng rennet bê và mè đầu của bột chất chuẩn đối chứng rennet bò là 1 000 IMCU/g. Các chất chuẩn đối chứng tiếp theo phải tương ứng với các chất chuẩn đối chứng trước đó (xem ISO 11815).

Tiêu chuẩn này quy định việc cài đặt sắc ký trao đổi anion thủ công và tự động.

Phương pháp này là phương pháp chuẩn, do đó mọi thay đổi chỉ được công nhận nếu có thay đổi vẫn cho kết quả tương đương, độ lặp lại và độ tái lập ít nhất phải bằng phương pháp chuẩn gốc. Mọi thay đổi phải được nêu trong báo cáo kết quả thử nghiệm (xem Điều 10).

### 4 Thuốc thử

Chỉ sử dụng các thuốc thử loại tinh khiết phân tích và nước được sử dụng phải là nước cất hoặc nước đã loại khoáng hoặc nước có độ tinh khiết tương đương, trừ khi có quy định khác.

**4.1 Resin**, của Fractogel<sup>®</sup> EMD DEAE (M) (Merck cat. no. 1.16883)<sup>1)</sup> hoặc cột nhồi Mono Q<sup>®</sup> 1 ml (HR 5/5 hoặc 5/50 GL từ GE Healthcare)<sup>2)</sup> hoặc resin tương đương.

CHÚ THÍCH 1: Fractogel<sup>®</sup> EMD DEAE (M) là resin thích hợp cho sắc ký thủ công và Mono Q<sup>®</sup> là thích hợp cho sắc ký tự động.

CHÚ THÍCH 2: Nếu Fractogel<sup>®</sup> và Mono Q là các resin được thay thế bằng resin khác, thì phải thay đổi các dung dịch đệm trong 4.12 và cần đánh giá lại phương pháp này.

**4.2 Piperazin ngậm sáu phân tử nước** (C<sub>4</sub>H<sub>10</sub>N<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O).

**4.3 Natri clorua** (NaCl).

**4.4 Thymol**, chất bảo quản tùy chọn.

**4.5 Natri hydroxit** (NaOH).

**4.6 Dung dịch axit clohydric**, c(HCl) = 1 mol/l.

**4.7 Etanol** (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH), ít nhất 96 % thể tích.

**4.8 Etanol** (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH), ít nhất 20 % thể tích.

Cho 105 ml etanol 96 % (4.7) vào 400 ml nước và trộn. Nếu phải lọc để khử trùng thì lọc nước trước khi trộn với etanol.

---

<sup>1)</sup> Fractogel<sup>®</sup> EMD DEAE (M) là ví dụ về sản phẩm phù hợp bán sẵn. Thông tin này đưa ra tạo thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn và không ấn định phải sử dụng chúng.

<sup>2)</sup> Cột được nhồi trước Mono Q<sup>®</sup> 1 ml là ví dụ về sản phẩm phù hợp bán sẵn. Thông tin này đưa ra tạo thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn và không ấn định phải sử dụng chúng.

**4.9 Ure**,  $c(\text{N}_2\text{H}_4\text{CO}) = 8 \text{ mol/l}$ .

Hòa 48 g ure trong nước và thêm nước để có tổng thể tích 100 ml.

**4.10 Ống thấm tách**, đường kính khoảng 1 cm (Union Carbide)<sup>3)</sup> hoặc loại tương đương (tùy chọn).

CHÚ THÍCH: Chất lượng của ống thấm tách không phải là yếu tố quyết định.

**4.11 Cột loại muối**, Bio-Rad – Econopac 10DG (cat. no. 732-2010)<sup>4)</sup> hoặc loại tương đương (tùy chọn).

Sử dụng ống thấm tách (4.10) hoặc cột khử muối để loại muối của rennet.

**4.12 Dung dịch đệm****4.12.1 Dung dịch đệm I**, piperazin  $[(\text{CH}_2)_4(\text{NH})_2]$ ,  $c[(\text{CH}_2)_4(\text{NH})_2] = 0,025 \text{ mol/l}$ .

Cân 4,85 g piperazin (4.2) và 42,8 g dung dịch axit clohydric (4.6) trong cốc có mỏ và trộn. Chuyển định lượng phần chứa trong cốc có mỏ sang bình định mức một vạch 1 000 ml (5.5), thêm nước đến vạch và trộn. pH của dung dịch phải bằng  $5,30 \pm 0,05$ , nếu không thì chỉnh bằng piperazin hoặc axit clohydric. Trước khi sử dụng, loại khí và bảo quản dung dịch đệm như quy định trong 4.12.5.

**4.12.2 Dung dịch đệm II**,  $c(\text{NaCl}) = 0,25 \text{ mol/l}$ 

Cân 14,6 g NaCl cho vào bình định mức một vạch 1 000 ml (5.5). Thêm dung dịch đệm I (4.12.1) đến vạch và trộn. Không điều chỉnh pH. Chỉ sử dụng dung dịch đệm II cho phương pháp sắc ký cài đặt thủ công. Trước khi sử dụng, loại khí và bảo quản dung dịch đệm như quy định trong 4.12.5.

**4.12.3 Dung dịch đệm III**,  $c(\text{NaCl}) = 0,50 \text{ mol/l}$ 

Cân 29,2 g NaCl cho vào bình định mức một vạch 1 000 ml (5.5). Thêm dung dịch đệm I (4.12.1) đến vạch và trộn. Không điều chỉnh pH. Chỉ sử dụng dung dịch đệm III cho phương pháp sắc ký cài đặt thủ công. Trước khi sử dụng, loại khí và bảo quản dung dịch bằng dung dịch đệm như quy định trong 4.12.5.

**4.12.4 Dung dịch đệm IV**,  $c(\text{NaCl}) = 1,0 \text{ mol/l}$ 

Cân 58,4 g NaCl cho vào bình định mức một vạch 1 000 ml (5.5). Thêm dung dịch đệm I (4.12.1) đến vạch và trộn. Không điều chỉnh pH. Trước khi sử dụng, loại khí và bảo quản dung dịch bằng dung dịch đệm như quy định trong 4.12.5.

<sup>3)</sup> Union Carbide là ví dụ về sản phẩm phù hợp bán sẵn. Thông tin này đưa ra tạo thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn và không ấn định phải sử dụng chúng.

<sup>4)</sup> Bio-Rad – Econopac 10DC là ví dụ về sản phẩm phù hợp bán sẵn. Thông tin này đưa ra tạo thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn và không ấn định phải sử dụng chúng.

#### **4.12.5 Loại khí và bảo quản**

Trước khi sử dụng, loại khí các dung dịch đệm I đến IV (4.12.1 đến 4.12.4) trong chân không hoặc bằng bể siêu âm. Phương pháp sắc ký cài đặt thủ công bảo quản các dung dịch đệm I đến IV bằng cách thêm vài tinh thể thymol, trong phương pháp sắc ký tự động bảo quản các dung dịch đệm I đến IV bằng cách lọc khử trùng qua bộ lọc cỡ lỗ 0,2 µm.

Các dung dịch đệm I đến IV khi để ở nhiệt độ phòng có thể bền được 5 ngày hoặc khi để trong tủ lạnh có thể bền được 2 tháng.

### **5 Thiết bị, dụng cụ**

Sử dụng các thiết bị, dụng cụ phòng thử nghiệm thông thường và cụ thể như sau:

**5.1 Bơm nhu động nhiều nhánh hoặc bơm thích hợp khác** (chỉ dùng cho cài đặt thủ công).

**5.2 Máy đo pH**, có độ nhạy  $\pm 0,01$  đơn vị pH.

**5.3 Cột sắc ký**, đường kính khoảng 1,0 cm, dài 10 cm, có một bộ điều chỉnh tốc độ dòng hoặc cột tương đương thích hợp với chiều cao lớp gel 5 cm (chỉ dùng cho cài đặt thủ công).

**5.4 Bộ khuấy từ.**

**5.5 Bình định mức một vạch**, có các dung tích yêu cầu, TCVN 7153 (ISO 1042)<sup>[2]</sup>.

**5.6 Thiết bị FPLC<sup>(5)</sup>, ÄKTA<sup>(6)</sup> hoặc thiết bị HPLC**, thích hợp với mục đích sử dụng, chỉ dùng cho cài đặt tự động.

**5.7 Thiết bị phòng thử nghiệm**, để xác định thời gian đồng tụ (xem ISO 11815).

### **6 Lấy mẫu**

Việc lấy mẫu không qui định trong tiêu chuẩn này. Nên lấy mẫu trong TCVN 6400 (ISO 707).

CHÚ THÍCH 1: Lấy mẫu rennet dạng lỏng, theo Điều 9 trong TCVN 6400 (ISO 707) và lấy mẫu rennet dạng bột theo Điều 13 trong TCVN 6400 (ISO 707).

Mẫu gửi đến phòng thử nghiệm phải đúng là mẫu đại diện và không bị thay đổi hoặc hư hỏng trong quá trình bảo quản hoặc vận chuyển.

<sup>5)</sup> FPLC<sup>®</sup> là ví dụ về sản phẩm phù hợp bán sẵn. Thông tin này đưa ra tạo thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn và không ấn định phải sử dụng chúng.

<sup>6)</sup> ÄKTA<sup>®</sup> là ví dụ về sản phẩm phù hợp bán sẵn. Thông tin này đưa ra tạo thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn và không ấn định phải sử dụng chúng.

CHÚ THÍCH 2: Các sản phẩm dạng bột có thể tách rời rất nhanh.

Bảo quản các mẫu thử ở nơi tối ở nhiệt độ từ 0 °C đến 5 °C.

## 7 Chuẩn bị mẫu thử

### 7.1 Kiểm tra

Trước khi xác định, kiểm tra rennet bằng phương pháp thích hợp để chắc chắn không có các enzym đồng tụ sữa chính có nguồn gốc không phải từ bò (xem Phụ lục A). Tuy nhiên, có thể không cần bước kiểm tra này nếu đã biết trước rennet chỉ chứa chymosin và pepsin bò.

### 7.2 Chuẩn bị cột mới chứa Fractogel

Sau khi loại khí trong điều kiện chân không, rót huyền phù resin Fractogel đã chuẩn bị (4.1) trực tiếp từ chai hoặc sử dụng bể siêu âm sang cột (5.3), cố định phương thẳng đứng với đầu ra mở, cho đến khi lớp resin Fractogel cao 4,5 cm đến 5,5 cm. Không để lớp gel chảy khô trong suốt quá trình vận hành.

Đậy đầu ra của ống. Nhúng ống đầu vào của bơm nhu động vào cốc có mở chứa dung dịch đệm I (4.12.1). Nối ống của bộ điều chỉnh vào ống đầu ra của bơm. Chỉnh tốc độ dòng đến 1,3 ml/min  $\pm$  0,1 ml/min. Làm đầy ống của bộ điều chỉnh bằng dung dịch đệm I (4.12.1), nhưng tổng thể tích không quá 1,5 ml.

Đậy cột bằng bộ điều chỉnh theo hướng dẫn của nhà cung cấp cột. Nén lớp gel vài milimet bằng bộ điều chỉnh để không tạo khoảng trống trên lớp gel. Không để lẫn bọt khí vào cột. Tráng cột bằng dung dịch đệm I (4.12.1) trong 5 min ở tốc độ dòng 1,3 ml/min.

### 7.3 Phục hồi và cân bằng resin Fractogel trong cột

Sau khi chuẩn bị cột mới và sau mỗi lần sử dụng, phục hồi và cân bằng resin Fractogel (4.1) trong cột như sau:

Phục hồi resin Fractogel trong cột ở tốc độ dòng 1,3 ml/min sử dụng ít nhất 15 ml dung dịch đệm IV (4.12.4) (khoảng 11,5 min). Cân bằng cột dùng ít nhất 40 ml dung dịch đệm I (4.12.1) (khoảng 30 min). Lúc này cột đã sẵn sàng để nạp mẫu.

Mỗi cột có thể sử dụng được 20 lần. Sau khi sử dụng thường xuyên cần dùng dung dịch NaOH 0,1 mol/l để rửa trong 10 min rồi rửa bằng nước trong 10 min để rửa cột phục hồi tốt hơn. Sau đó thực hiện quy trình phục hồi và cân bằng thông thường như trên.

### 7.4 Bảo quản cột chứa Fractogel

Nếu cột đã được bảo quản quá một tuần, rửa cột với ít nhất 15 ml etanol 20 % (4.8) sử dụng bơm nhu động (5.1). Bảo quản cột bằng cách đóng kín đầu vào và đầu ra.

## **TCVN 10021:2013**

Cột có thể bảo quản được vài tháng ở nhiệt độ phòng tránh ánh nắng trực tiếp.

### **7.5 Chuẩn bị mẫu thử**

#### **7.5.1 Yêu cầu chung**

Có thể sử dụng trực tiếp mẫu ở dạng lỏng, theo 7.5.2.

Đối với mẫu rennet dạng bột, chuẩn bị như sau: Hòa tan mẫu rennet dạng bột để có được 200 IMCU/ml trong một lượng dung dịch đệm I (4.12.1) thích hợp hoặc bằng cách sử dụng dung dịch đệm có pH 5,5 (xem ISO 11815) trước khi loại muối.

Xác định thời gian đông tụ của mẫu rennet hòa tan theo ISO 11815 trước khi loại muối. Ước tính sơ bộ nồng độ của mẫu, bằng IMCU/ml bằng cách đo tương ứng với chất chuẩn đối chứng rennet bê để xác định lượng mẫu cần đưa lên cột (7.6.1 hoặc 7.6.2).

Nếu các kết quả được biểu thị bằng miligam trên lit, thì xác định thời gian đông tụ của mẫu rennet ít nhất hai lần theo ISO 11815. Khi đó, đo thời gian đông tụ đồng thời hoặc đo liên tục "trước" và "sau" khi loại muối.

Trước khi nạp mẫu lên cột, loại muối bằng thẩm tách (7.5.2) hoặc bằng lọc gel (7.5.3).

#### **7.5.2 Loại muối bằng thẩm tách**

Nhúng ống thẩm tách (4.10) vào nước đang sôi trong khoảng 5 min và rửa phía trong và ngoài ống bằng nước.

Thẩm tách 5 ml mẫu thử đã chuẩn bị (7.5) để kiểm tra (khoảng 900 IMCU) dựa theo 500 ml dung dịch đệm I (4.12.1) ở 4 °C ít nhất 5 h nhưng không quá 20 h. Nén ống thẩm tách thật chặt bằng cách dùng tay đóng ống để giảm dịch pha loãng xuất hiện trong quá trình thẩm tách. Dùng bộ khuấy từ (5.4) để khuấy trong quá trình thẩm tách.

Nếu các kết quả biểu thị bằng miligam trên lit, xác định thời gian đông tụ của mẫu rennet đã thẩm tách ít nhất hai lần theo ISO 11815.

#### **7.5.3 Loại muối bằng lọc gel**

Thực hiện theo hướng dẫn của nhà cung cấp.

Cân bằng cột loại muối (4.11) bằng dung dịch đệm I (4.12.1). Đưa 3,3 ml mẫu thử đã chuẩn bị (7.5) lên cột. Rửa giải mẫu bằng 4,0 ml dung dịch đệm I (4.12.1).



Đối với các mẫu thử có chứa một lượng nhỏ chymosin hoặc pepsin, thì đôi khi cần thực hiện quy trình nói trên hai lần để có đủ hoạt độ để có thể xác định được thành phần thấp.

Nếu các kết quả biểu thị bằng miligam trên lit, xác định thời gian đông tụ của mẫu rennet đã lọc gel ít nhất hai lần theo ISO 11815.

#### 7.5.4 Thời gian sử dụng cột

Để kéo dài thời gian sử dụng cột và tránh tắc cột, nên thực hiện quy trình sau đây để làm sạch định kỳ cột loại muối.

Sau mỗi ngày sử dụng, tráng rửa toàn bộ cột bằng nước vòi sạch hoặc nước cất. Cho khoảng 5 ml dung dịch ure 8 mol/l lên cột và xả đi. Rửa lại cột bằng nước vòi và cân bằng cột bằng cách cho dung dịch đệm I (4.12.1) chảy qua cột.

Bảo quản cột đã cân bằng ở nơi mát với một ít dung dịch đệm ngập trên bề mặt gel. Để bảo quản trong thời gian dài, nên bảo quản cột trong dung dịch đệm hoặc trong nước cất có bổ sung chất bảo quản (xem chỉ dẫn của nhà cung cấp). Khi thực hiện theo quy trình này thì cột có thể sử dụng được 2 năm hoặc cho đến khi tốc độ dòng giảm đáng kể.

### 7.6 Phân tích rennet đã loại muối

#### 7.6.1 Tách chymosin và pepsin bằng cột thông thường – Cài đặt thủ công

Sau khi cân bằng cột trong 7.3, sử dụng máy bơm (5.1) đưa lên cột một lượng mẫu thử đã loại muối (7.5.2 hoặc 7.5.3), bằng cách nhúng đầu cuối ống hút của bơm vào ống đựng mẫu thử. Cài đặt tốc độ dòng ở 1,3 ml/min.

Lượng mẫu thử cần đủ để sau khi tách cho thời gian đông tụ đối với phân đoạn yếu nhất là từ 350 s đến 550 s khi có thể, nhưng không quá nhiều để có thể phát hiện hoạt độ trong phân đoạn trung gian hoặc trong dịch rửa giải sau phân đoạn thứ hai. Trong hầu hết các trường hợp, lượng dung dịch mẫu thử từ 3 ml đến tối đa 5 ml là đủ. Tuy nhiên, tổng lượng IMCU đưa lên cột không vượt quá 900 IMCU. Nếu kết quả được biểu thị bằng miligam trên lit thì cần biết chính xác lượng đưa lên cột. Điều này là không cần thiết nếu kết quả được biểu thị theo tỷ lệ phần trăm.

Khi mẫu đã vào hết trong ống, rửa ống bằng 1 ml dung dịch đệm II (4.12.2). Tránh lẫn bọt khí vào ống. Lặp lại quy trình rửa khi nước rửa đầu tiên đã vào ống hút.

Nhúng đầu cuối của ống hút vào cốc có mở có chứa ít nhất 50 ml dung dịch đệm II (4.12.2). Thu lấy phần rửa giải đầu tiên vào bình định mức một vạch 50 ml (5.5). Thu lấy chính xác khoảng 47 ml cho vào bình định mức một vạch 50 ml hoặc bình thích hợp khác. Thêm dung dịch đệm II (4.12.2) đến vạch.

## TCVN 10021:2013

Sau đó thu lấy 3 ml cho vào cốc nhỏ có mỏ, được coi như phân đoạn trung gian.

Sau đó, nhúng đầu ống hút của máy bơm nhu động (5.1) cho vào cốc có mỏ chứa ít nhất 50 ml dung dịch đệm III (4.12.3). Thu lấy phân đoạn rửa giải thứ hai cho vào một bình định mức một vạch 50 ml (5.5) khác. Thu lấy chính xác 47 ml cho vào một bình định mức một vạch 50 ml. Thêm dung dịch đệm III (4.12.3) đến vạch.

Sau đó thu lấy 3 ml vào một cốc có mỏ nhỏ, được coi là phân đoạn sau.

CHÚ THÍCH: Phân đoạn rửa giải đầu tiên chứa các chymosin. Phân đoạn trung gian được sử dụng để kiểm tra việc tách hai enzym. Phân đoạn rửa giải thứ hai chứa pepsin bò. Phân đoạn sau được sử dụng để kiểm tra xem tất cả các pepsin đã được rửa giải hết chưa.

Nếu mẫu được biết có chứa một lượng rất nhỏ chymosin hoặc pepsin thì các phân đoạn rửa giải thứ nhất và thứ hai có thể được thu nhận vào các bình định mức nhỏ hơn, ví dụ 25 ml.

### 7.6.2 Tách chymosin và pepsin bằng FPLC<sup>®</sup>/ÄKTA<sup>®</sup>/HPLC – Cài đặt tự động

7.6.2.1 Thực hiện theo các hướng dẫn chung đối với thiết bị (5.6) và cột Mono Q (4.1) chỉ sử dụng các dung dịch đệm I (4.12.1) và IV (4.12.4).

Xây dựng chương trình phân tích. Kiểm tra độ chính xác của việc tách và sự phù hợp của các kết quả thu được bằng phương pháp chuẩn cài đặt thủ công. Trong cài đặt tự động, phép sắc ký được giảm 5 lần, nghĩa là thu lấy các phân đoạn 10 ml thay cho các phân đoạn 50 ml thu được trong phương pháp sắc ký cài đặt thủ công. Ngoài ra, không cần thiết thu lấy phân đoạn trung gian, vì sắc ký đồ cho thấy chymosin và pepsin được tách rời hoàn toàn thành hai enzym trong mỗi lần tách.

Nếu cột không được sử dụng trong ít nhất 24 h thì thực hiện chạy dung dịch đệm I (4.12.1) thay cho mẫu thử.

7.6.2.2 Các hướng dẫn sau đây về chương trình phù hợp để áp dụng 0,5 ml hoặc 1,0 ml dung dịch mẫu thử.

a) Bắt đầu (từ 0,0 ml dung dịch đệm) với 100 % dung dịch đệm I (4.12.1) ở tốc độ dòng 2 ml/min và ghi lại ở 280 nm. Bơm mẫu, đã được đưa trước vào vòng bơm 0,500 ml hoặc 1,000 ml mẫu, lên cột.

b) Sau khi rửa giải hết 0,60 ml dung dịch đệm I (4.12.1), bắt đầu thu lấy phân đoạn thứ nhất (phân đoạn chứa chymosin).

c) Sau khi rửa giải hết 1,50 ml dung dịch đệm I, thay dung dịch đệm I bằng hỗn hợp dung dịch đệm của 80 % dung dịch đệm I (4.12.1) và 20 % dung dịch đệm IV (4.12.4) để rửa giải phân đoạn chymosin.

d) Sau khi rửa giải hết 10,60 ml hỗn hợp của dung dịch đệm I và dung dịch đệm IV, ngừng thu nhận phân đoạn thứ nhất (thể tích là 10 ml) và thay hỗn hợp của dung dịch đệm I và IV bằng hỗn hợp của 50 % dung dịch đệm I (4.12.1) và 50 % dung dịch đệm IV (4.12.4) để vừa rửa giải vừa bắt đầu thu thập phân đoạn thứ hai (phân đoạn chứa pepsin).

e) Sau khi rửa giải hết 20,60 ml hỗn hợp dung dịch đệm, ngừng thu nhận phân đoạn thứ hai (10 ml) và thay hỗn hợp 50 % mỗi dung dịch đệm I và IV bằng 100 % dung dịch đệm IV (4.12.4) để rửa cột.

f) Sau khi rửa giải tổng 25,60 ml hỗn hợp dung dịch đệm, thay dung dịch đệm IV bằng 100 % dung dịch đệm I (4.12.1) để cân bằng cột.

g) Sau khi rửa giải tổng 32,60 ml dung dịch đệm, thì kết thúc chương trình.

### **7.6.2.3 Chạy sắc ký mẫu thử như sau.**

Bơm trước rennet đã loại muối vào vòng bơm 0,500 ml hoặc 1,000 ml, lượng IMCU càng nhiều càng tốt, nhưng tổng không quá 180 IMCU. Bắt đầu chạy sắc ký và thu lấy hai phân đoạn. Xác định thời gian đồng tụ của phân đoạn thứ nhất và phân đoạn thứ hai theo ISO 11815.

Nếu mẫu được biết có chứa một lượng rất nhỏ của chymosin (rennet bò) hoặc pepsin (rennet bê), thì có thể thay bằng 5 ml, vì một lượng nhỏ của một trong hai enzym này được rửa giải trong phân đoạn 5 ml rửa giải đầu tiên, có thể kiểm tra được trên sắc ký đồ. Nếu tất cả các enzym được rửa giải trong phân đoạn 5 ml đầu tiên thì hoạt độ chỉ được đo trong phân đoạn đó và việc tính được điều chỉnh tương ứng bằng cách chia IMCU/ml cần tính cho 2. Kiểm tra xem phân đoạn 5 ml khác có thời gian đồng tụ lớn hơn 1 800 s hay không.

Nhìn chung, khuyến cáo rằng mẫu có thành phần đã biết cần bao trùm các khoảng thời gian đồng tụ đều đặn, đặc biệt là khi sử dụng phương pháp cài đặt tự động.

Điều chỉnh chương trình nếu việc tách chymosin và pepsin là không hoàn toàn.

## **7.7 Xác định thời gian đồng tụ**

Trộn mỗi phân đoạn thu được trong 7.6.1 hoặc 7.6.2 thật kỹ trước khi lấy mỗi phần mẫu thử. Chuẩn bị các dung dịch pha loãng cần thiết bằng dung dịch đệm II (4.12.2) đối với phân đoạn rửa giải đầu tiên và bằng dung dịch đệm III (4.12.3) đối với phân đoạn rửa giải thứ hai.

Xác định thời gian đồng tụ của phân đoạn rửa giải đầu tiên và phân đoạn rửa giải thứ hai theo ISO 11815 trong khi xem xét các vấn đề sau đây.

Xác định phân đoạn rửa giải đầu tiên cùng với dung dịch làm việc đối chứng rennet bê và phân đoạn rửa giải thứ hai cùng với dung dịch làm việc đối chứng rennet bò. Xác định thời gian đồng tụ hai lần liên tiếp đối với mỗi cặp "dung dịch làm việc đối chứng-phân đoạn rửa giải", sử dụng thời gian trung bình để tính kết quả.

Ngoài ra, đối với mỗi phép phân tích đồng tụ sữa trong ISO 11815, có thể sử dụng thể tích mẫu lớn gấp năm lần bổ sung vào sữa, để thu được thời gian đồng tụ trong khoảng từ 350 s đến 550 s, khi cần.

Tuy nhiên, trong những trường hợp này, pha loãng dung dịch làm việc đối chứng rennet tương ứng trong cùng dung dịch đệm như đã sử dụng để rửa giải phần cụ thể, để duy trì các điều kiện đồng tụ tương tự đối với dung dịch mẫu và dung dịch làm việc đối chứng rennet. Điều đó có nghĩa rằng nếu cần đến thể tích mẫu thử lớn gấp ba lần (1,5 ml thay vì 0,5 ml), thì dung dịch làm việc đối chứng rennet cũng cần được pha loãng ba lần (1,5 ml thay vì 0,5 ml) đối với phép thử đồng tụ (ISO 11815, 9.5.1).

Trong các phân đoạn dịch rửa giải mẫu thử chứa mức chymosin hoặc pepsin rất thấp, thì được phép sử dụng thời gian đồng tụ dài hơn 550 s sau khi bổ sung khối lượng mẫu lớn gấp năm lần để thử nghiệm.

Xác định thời gian đồng tụ của các phân đoạn rửa giải trung gian và cuối cùng bằng cách thêm thể tích lớn gấp năm lần so với lượng mẫu bình thường (2,5 ml/25 ml sữa). Các thời gian đồng tụ này cần vượt quá 1 800 s vì thời gian đồng tụ ngắn hơn cho thấy việc tách không đạt yêu cầu.

Thực hiện tất cả các phép phân tích càng sớm càng tốt sau khi tách chymosin và pepsin, vì có thể có sự biến tính của các enzym trong các dung dịch đã pha loãng.

## **8 Tính và biểu thị kết quả**

### **8.1 Tính hoạt độ chymosin và pepsin, biểu thị bằng phần trăm**

Hoạt độ chymosin và pepsin bò, tính bằng IMCU trong một mililit, như được mô tả trong ISO 11815, có thể được chuyển đổi thành tỷ lệ phần trăm chymosin,  $a_c$ , và tỷ lệ phần trăm pepsin,  $a_p$ , sử dụng Công thức (1) và Công thức (2).

$$a_c = \frac{n_c \times 100}{n_c + n_p} \quad (1)$$

$$a_p = 100 - a_c \quad (2)$$

Trong đó:

$n_c$  là hàm lượng chymosin, tính bằng IMCU trên mililit (IMCU/ml);

$n_p$  là hàm lượng pepsin, tính bằng IMCU trên mililit (IMCU/ml).

## 8.2 Tính hoạt độ chymosin và hoạt độ pepsin bò bằng miligam trên lít

Biểu thị nồng độ hoạt động của chymosin và pepsin bò bằng miligam trên lít nếu sữa bột chuẩn được sử dụng để chuẩn bị cơ chất. Các hệ số  $K_c$ ,  $K_p$ ,  $f_c$  và  $f_p$  của sữa bột chuẩn sẵn có từ nhà cung cấp (Cecalait) 7)<sup>7)</sup>. Xác định nồng độ như trong ISO 11815 sử dụng công thức (3):

$$\rho_x = \frac{K_x}{t_x - f_x} \frac{V}{V_p} d \frac{t_2}{t_1} \quad (3)$$

Trong đó:

- $\rho_x$  là nồng độ của chymosin  $\rho_c$ , hoặc pepsin bò  $\rho_p$ , trong chế phẩm enzym, tính bằng miligam trên lít (mg/l);
- $K_x$  là hệ số  $K_c$  hoặc  $K_p$  được sử dụng để tính nồng độ hoạt động chymosin và pepsin bò, tính bằng miligam trên lít (mg/l);
- $t_x$  là thời gian đông tụ thu được với 0,5 ml của phân đoạn rửa giải đầu tiên,  $t_c$ , hoặc thứ hai,  $t_p$ , được pha loãng hoặc được làm đặc  $F$  lần (xem 7.7 và dưới đây), tính bằng giây (s);
- $f_x$  là hệ số hiệu chỉnh  $f_c$  hoặc  $f_p$ , đối với thời gian ngưng tụ trễ, tính bằng giây (s);
- $V_p$  là thể tích của chế phẩm đã khử muối được sử dụng để phân tích (7.6), tính bằng mililit (ml);
- $V$  là thể tích phần dịch rửa giải thu được ( $V = 50$  ml), tính bằng mililit (ml);
- $d$  là hệ số pha loãng hoặc làm đặc phần được phân tích (ví dụ  $d = 3$  khi 1 ml phần mẫu đã được pha loãng với 2 ml dung dịch đệm trước khi thử nghiệm đông tụ và  $d = 0,25$  khi sử dụng 2 ml thay vì sử dụng 0,5 ml cho 25 ml sữa trong phép thử đông tụ);
- $t_1$  là thời gian đông tụ thu được với chế phẩm enzym đã pha loãng (7.5), tính bằng giây (s);
- $t_2$  là thời gian đông tụ thu được với chế phẩm enzym đã khử muối ở cùng một độ pha loãng (7.5.2 hoặc 7.5.3), tính bằng giây (s).

Đối với sữa bột và một enzym nhất định, có được hệ số  $f$  bằng cách dựng đồ thị thời gian đông tụ theo  $1/\rho$  (xem Ví dụ). Theo Công thức Holter's  $t = f + b/c$ , trong đó  $f$  là giá trị ngoại suy của  $t$  đối với  $b/c = 0$ . Các nhà cung cấp sữa bột chuẩn cũng cung cấp các hệ số  $f$ .

<sup>7)</sup> Cecalait, rue de Versailles, BP.70129, 39808 POLIGNY Pháp (email: secretariat@cecalait.fr) là ví dụ về sản phẩm phù hợp bán sẵn. Thông tin này đưa ra tạo thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn và không ấn định phải sử dụng chúng.

## TCVN 10021:2013

VÍ DỤ:

Để xác định hằng số  $f$  đối với phần chymosin, chuẩn bị 100 ml dung dịch chymosin tinh khiết đậm đặc trong dung dịch đệm II (4.12.2). Chế phẩm này có thể thu được từ một hoặc một vài phép tách sắc ký rennet bê (phân đoạn rửa giải đầu tiên). Sau đó, chuẩn bị ít nhất sáu dung dịch pha loãng khác nhau của chế phẩm này với dung dịch đệm II (4.12.2).

Xác định thời gian đông tụ của các dung dịch pha loãng khác nhau theo phương pháp quy định trong ISO 11815. Các giá trị thời gian đông tụ cần được phân bố đều trong khoảng từ 240 s đến 1 200 s.

Giá trị  $\rho$  đối với dung dịch pha loãng thấp nhất (thời gian đông tụ gần 300 s) được cài đặt đến 1,00 và các giá trị đối với các độ pha loãng khác được thiết lập tương ứng, ví dụ 0,50 (1/2), 0,33 (1/3), 0,25 (1/4), v.v... Dụng đồ thí  $t = d (1/\rho)$  và tính hệ số tương quan,  $r$ . Nếu  $r$  bằng hoặc lớn hơn 0,999, thì có thể để xác định hằng số  $f$ , nếu  $r$  thấp hơn 0,999, thì chuẩn bị các dung dịch pha loãng mới và lặp lại các phép đo thời gian đông tụ.

Để xác định hằng số  $f$  đối với phần chứa pepsin bò, thì chuẩn bị 100 ml dung dịch pepsin bò tinh khiết đậm đặc trong dung dịch đệm III (4.12.3). Chế phẩm này có thể thu được bằng một hoặc một vài phép tách sắc ký rennet bò (phân đoạn rửa giải thứ hai). Sau đó, chuẩn bị ít nhất sáu dung dịch pha loãng khác nhau của chế phẩm này với dung dịch đệm III (4.12.3).

Xác định thời gian đông tụ nằm trong giới hạn thời gian tương tự như đối với phần chymosin và tính  $r$ . Nếu  $r$  bằng hoặc hơn 0,999 thì có thể xác định được hằng số  $f$ .

### 8.3 Biểu thị kết quả

Biểu thị kết quả thử nghiệm đến số nguyên.

## 9 Độ chụm

### 9.1 Phép thử liên phòng thử nghiệm

Các giá trị về thông số độ chụm thu được từ các kết quả của nghiên cứu liên phòng trên rennet dạng lỏng, thực hiện năm 1995 phù hợp với ISO 5725<sup>8)</sup>. Kết quả của phép thử liên phòng đã được phân tích thống kê theo TCVN 6910-1 (ISO 5725-1)<sup>[3]</sup> và TCVN 6910-2 (ISO 5725-2)<sup>[4]</sup> và tháng 3 năm 2009. Các giá trị thu được này có thể không áp dụng được cho các dải nồng độ và chất nền khác với dải nồng độ và chất nền đã nêu.

Kết quả nghiên cứu được nêu trong Phụ lục B.

CHÚ THÍCH 1: Các giá trị về độ lặp lại và độ tái lập thu được từ độ lệch chuẩn  $s_0$  là các giá trị ước tính của độ lệch chuẩn đúng của phương pháp. Mỗi giá trị đã cho độ lặp lại và độ tái lập là chênh lệch tối đa giữa hai kết quả thử nghiệm được dự kiến trong 95 % các trường hợp khi so sánh hai kết quả. Nếu có ít hơn 95 % các trường hợp nằm trong các giá trị nêu trong 9.2 và 9.3, thì nên cải tiến trình tự của phương pháp phân tích.

CHÚ THÍCH 2: Do một số sự khác nhau về độ hòa tan và mức độ không đồng đều nhất định của bột rennet, mà các tỷ lệ phần trăm đối với thông số về độ chụm, độ lặp lại và độ tái lập có thể hơi cao hơn khi phân tích bột rennet.

<sup>8)</sup> ISO 5725:1986 đến nay đã hủy và được thay thế bằng ISO 5725-1 (được chấp nhận thành TCVN 6910-1)<sup>[3]</sup> và ISO 5725-2 (được chấp nhận thành TCVN 6910-2)<sup>[4]</sup>

## 9.2 Độ lặp lại

Độ lệch chuẩn lặp lại  $s_r$ , và hệ số biến thiên lặp lại,  $C_{V,r}$  biểu thị độ biến thiên của các kết quả phân tích độc lập thu được khi sử dụng cùng phương pháp thử trên vật liệu thử giống hệt nhau, do cùng một người phân tích sử dụng cùng một thiết bị, tiến hành trong cùng một phòng thử nghiệm, trong một khoảng thời gian ngắn, không được quá 5 % các trường hợp đối với rennet dạng lỏng lớn hơn a) hoặc b):

- a) 0,7 %  $s_r$  tính theo giá trị tuyệt đối khi biểu thị hoạt độ chymosin và pepsin theo phần trăm;
- b) 3,6 %  $C_{V,r}$  tính theo giá trị trung bình hàm lượng chymosin, biểu thị bằng miligam trên lít và 8,4 %  $C_{V,r}$  tính theo giá trị trung bình hàm lượng pepsin, biểu thị bằng miligam trên lít.

Nếu hai phép xác định thu được trong các điều kiện này, thì chênh lệch tuyệt đối,  $r$ , giữa hai kết quả đối với rennet dạng lỏng không được vượt quá 2,0 % giá trị tuyệt đối của phần trăm hoạt độ chymosin và pepsin.

## 9.3 Độ tái lập

Độ lệch chuẩn tái lập  $s_R$ , và hệ số biến thiên tái lập,  $C_{V,R}$  biểu thị độ biến thiên của các kết quả phân tích độc lập thu được khi sử dụng cùng phương pháp thử trên vật liệu thử giống hệt nhau, do các người phân tích khác nhau thực hiện trong các phòng thử nghiệm khác nhau, sử dụng các thiết bị khác nhau, không được quá 5 % các trường hợp đối với rennet dạng lỏng, lớn hơn a) hoặc b):

- a) 1,2 %  $s_R$  tính theo giá trị tuyệt đối khi biểu thị hoạt độ chymosin và pepsin theo phần trăm;
- b) 6,9 %  $C_{V,R}$  tính theo giá trị trung bình hàm lượng chymosin, biểu thị bằng miligam trên lít và 12,0 %  $C_{V,R}$  tính theo giá trị trung bình hàm lượng pepsin, biểu thị bằng miligam trên lít.

CHÚ THÍCH 1: Ví dụ, nếu một phòng thử nghiệm xác định được 80 % chymosin, thì kết quả của phòng thí nghiệm khác không nên lệch quá 3,3 % so với 80 % tính theo giá trị tuyệt đối, nghĩa là kết quả nằm trong khoảng từ 76,7 % đến 83,3 %.

CHÚ THÍCH 2: Các giá trị về thông số độ chụm có giá trị khi xem xét nhiều phòng thử nghiệm. Kinh nghiệm cho thấy rằng các phòng thử nghiệm đã đào tạo có thể thực hiện phân tích với độ tái lập,  $R$ , 1,9 % tính theo giá trị tuyệt đối, khi biểu thị hoạt độ chymosin theo phần trăm.

Nếu hai phép xác định thu được trong các điều kiện này, thì chênh lệch tuyệt đối,  $R$ , giữa hai kết quả rennet dạng lỏng không được vượt quá 3,3 % giá trị tuyệt đối của hoạt độ chymosin và pepsin tính bằng phần trăm.

**10 Báo cáo thử nghiệm**

Báo cáo thử nghiệm phải bao gồm các thông tin sau:

- a) mọi thông tin cần thiết để nhận biết đầy đủ về mẫu thử (dạng lỏng hay dạng bột);
- b) phương pháp lấy mẫu đã sử dụng, nếu biết;
- c) phương pháp thử đã sử dụng và viện dẫn tiêu chuẩn này;
- d) tất cả các chi tiết thao tác không qui định trong tiêu chuẩn này, cùng với các chi tiết bất thường nào khác có thể ảnh hưởng tới kết quả;
- e) kết quả thử nghiệm thu được;
- f) nêu kết quả cuối cùng thu được nếu đáp ứng được yêu cầu về độ lặp lại.



## Phụ lục A (Tham khảo)

### Phép định tính bằng khuếch tán miễn dịch kép các enzym đông tụ sữa với các chất làm đông tụ có bán sẵn

#### A.1 Yêu cầu chung

Mục đích của phương pháp này là để xác định sự có mặt của một hoặc một số enzym trong sáu enzym làm đông tụ: chymosin, pepsin bò, pepsin lợn, các enzym từ *Rhizomucor (Mucor) miehei*, *Rhizomucor (Mucor) pusillus* và *Cryphonectria (Endothia) parasitica* trong rennet thương mại.

CHÚ THÍCH: Phương pháp nêu trong Phụ lục A là bổ sung cho phương pháp xác định hàm lượng chymosin và pepsin bò trong rennet bê và rennet bò. Phương pháp này có thể dùng để xác định chỉ khi có chymosin và pepsin bò trong chất chiết hoặc có mặt các enzym đông tụ sữa phổ biến (ngoài chymosin và pepsin bò). Trong trường hợp này, không áp dụng được phương pháp sắc ký. Không phải tất cả các enzym đông tụ sữa đều được xác định bằng phương pháp này, nhưng việc nhận biết sự có mặt chymosin và pepsin bò, cùng với sự không có mặt của các chất thay thế rennet phổ biến, khẳng định rằng rennet được phân tích có nguồn gốc từ bò.

Phương pháp này có thể áp dụng cho:

- a) tất cả các enzym làm đông tụ thu được từ dạ dày bò và lợn; và
- b) các enzym làm đông tụ hiện có trên thị trường thu được từ *Rhizomucor (Mucor) miehei*, *Rhizomucor (Mucor) pusillus* và *Cryphonectria (Endothia) parasitica*.

#### A.2 Nguyên tắc

Trong môi trường agarose, các chế phẩm kháng nguyên-kháng thể đặc thù cho thấy sự có mặt của các enzym đề cập ở trên trong chế phẩm rennet<sup>[10]</sup>. Bước đầu tiên là rót một lớp agarose lên phiến kính. Khi agarose đã đông đặc, khoan các giếng tròn nhỏ trong lớp agarose, một số giếng được đổ đầy kháng nguyên ở nồng độ khác nhau và các giếng khác được đổ đầy kháng huyết thanh. Từng chất đối kháng dịch chuyển về phía khác (khuếch tán miễn dịch kép) và xuất hiện kết tủa thành một đường khi các nồng độ tương ứng của kháng nguyên và kháng huyết thanh là tối ưu.

#### A.3 Thiết bị, dụng cụ

Sử dụng các thiết bị, dụng cụ của phòng thử nghiệm thông thường và cụ thể như sau:

**A.3.1 Phiến kính**, (10 cm x 10 cm) hoặc màng polyeste được phủ agarose, ví dụ: "Gelbond" của các chế phẩm sinh học hãng FMC, Rockland, Maine 04.841, USA<sup>9)</sup>.

<sup>9)</sup> "Gelbond" là ví dụ về sản phẩm phù hợp có bán sẵn. Thông tin này đưa ra tạo thuận tiện cho việc sử dụng tiêu chuẩn và không ấn định phải sử dụng chúng.

**A.3.2 Micropipet**, dung tích 4 µl và 15 µl.

**A.3.3 Máy khoan lỗ**, đường kính 2,5 mm và 4,0 mm.

**A.3.4 Khay nhựa**, để nhuộm và rửa phiến kính.

#### **A.4 Thuốc thử**

Chỉ sử dụng thuốc thử tinh khiết phân tích và nước cất hoặc nước đã loại khoáng hoặc nước có chất lượng tương đương.

CHÚ THÍCH: Những điều nói trên hoặc những thông tin cũng như các ví dụ nêu trong tiêu chuẩn này đưa ra tạo thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn và không ấn định phải sử dụng chúng.

**A.4.1 Agarose**, Indubiose A37 (IBF), loại HSA (Litex)<sup>10</sup> hoặc loại tương đương.

CHÚ THÍCH: Việc chọn agarose là không quan trọng.

**A.4.2 Natri clorua (NaCl)**.

**A.4.3 Etanol**, 95 %.

**A.4.4 Axit axetic (băng)**, 100 %.

**A.4.5 Kháng thể đặc hiệu đơn giá (Monospecific) và các dung dịch enzym đối chứng.**

Các kháng huyết thanh Monospecific và các dung dịch enzym đối chứng kèm theo các hướng dẫn cần thiết để sử dụng, có thể thu được từ INRA (FR) hoặc CHR. Hansen (DK)<sup>11</sup>.

**A.4.6 Xanh brilliant Coomassie**, thuốc nhuộm R-250 hoặc Blue Serva R<sup>12</sup>.

#### **A.5 Cách tiến hành**

##### **A.5.1 Chuẩn bị phiến đồ agarose**

**A.5.1.1 Natri clorua**, nồng độ khối lượng 9 g/l.

Hòa tan 9 g natri clorua trong 1 lít nước cất.

##### **A.5.1.2 Dung dịch agarose**

Cho 1 g agarose (A.4.1) vào 100 ml dung dịch natri clorua 0,9 % (A.5.1.1) và hòa tan trong nước bằng cách để trong nồi cách thủy ở 100 °C. Chuẩn bị gel agarose mới trước khi sử dụng.

---

<sup>10</sup> Indubiose A37 là ví dụ về sản phẩm phù hợp có bán sẵn. Thông tin này đưa ra tạo thuận tiện cho việc sử dụng tiêu chuẩn và không ấn định phải sử dụng chúng.

<sup>11</sup> INRA, du champ de Foire, 39800 Poligny, France and Chr. Hansen A/S, 1-27 Jernholmen, 2650 HVIDOVRE Denmark (Fax +45 36 86 77 76) là tổ chức cung cấp sản phẩm này.

<sup>12</sup> Thuốc nhuộm R-250 hoặc Blue Serva là ví dụ về sản phẩm phù hợp có bán sẵn. Thông tin này đưa ra tạo thuận tiện cho việc sử dụng tiêu chuẩn và không ấn định phải sử dụng chúng.

### A.5.1.3 Chuẩn bị phiến đồ agarose

Sau khi làm sạch các phiến kính bằng etanol, dùng bàn chải phủ lên phiến kính một lớp agarose. Khi sử dụng lớp màng agarose đã khô hoàn toàn, đặt các phiến kính theo phương nằm ngang, dùng pipet cho một lớp dung dịch agarose (A.5.1.2) ở 60 °C lên phiến kính và để cho đông đặc. Lớp này cần có độ dày 1,5 mm, ví dụ: đối với phiến đồ có kích thước 10 cm x 10 cm, thì cần đến 15 ml dung dịch agarose. Sử dụng màng polyeste đã phủ agarose, thì rót 15 ml dung dịch agarose lên với bề mặt có thể thấm nước và để cho đông đặc.

## A.5.2 Khuếch tán

### A.5.2.1 Chuẩn bị mẫu

Mẫu có thể được thử nghiệm mà không pha loãng nếu nồng độ chứa không quá 200 IMCU/ml hoặc được thử nghiệm với các độ pha loãng khác nhau (ví dụ 1/20 và 1/100) với nước. Pha loãng các dung dịch enzym đối chứng theo hướng dẫn của nhà sản xuất cung cấp các kháng nguyên và kháng huyết thanh.

### A.5.2.2 Chuẩn bị các phiến đồ agarose

Ngay trước khi bắt đầu khuếch tán, khoan các giếng hình trụ nhỏ trong agarose sử dụng khoan lỗ (A.3.3). Tùy theo thể tích mẫu (xem hướng dẫn), các giếng cần có đường kính 2,5 mm hoặc 4,0 mm. Tâm của các giếng có chứa mẫu phải được bố trí cách xa tâm của giếng chứa các kháng thể 5 mm (xem hình A.1).

### A.5.2.3 Đưa mẫu vào giếng

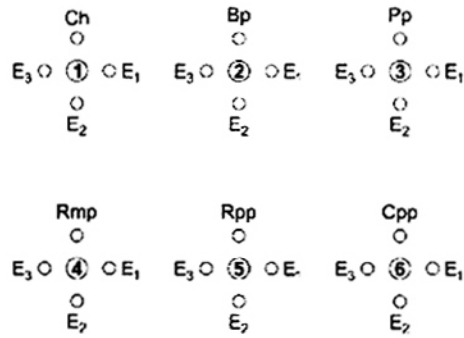
Tùy thuộc vào đường kính của giếng, sử dụng micropipet (A.3.2) để lấy 4 µl hoặc 15 µl mẫu cho vào giếng. Cho kháng huyết thanh vào giếng giữa, cho enzym đối chứng vào giếng phía trên và đưa mẫu để phân tích hai mẫu pha loãng vào ba giếng còn lại (xem hình A.1). Sau đó, để các phiến đồ này trong môi trường bão hòa hơi nước ở nhiệt độ phòng từ 10 h đến 15 h hoặc theo sự hướng dẫn của nhà cung cấp kháng huyết thanh và các dung dịch enzym đối chứng.

## A.5.3 Nhuộm các phiến đồ (tùy chọn)

Nhuộm các phiến đồ theo khuyến cáo để kết tủa nhiều và rõ ràng hơn.

### A.5.3.1 Chuẩn bị thuốc nhuộm

Hòa tan 5 g thuốc nhuộm xanh brilliant Coomassie (A.4.6) trong 1 lit dung môi hỗn hợp của etanol (A.4.3), axetic axit (A.4.4) và nước với các thể tích 4,5 + 1,0 + 4,5 tương ứng. Đun nóng dung dịch thu được đến 60 °C và lọc.



**CHÚ DẪN:**

1 là kháng huyết thanh thô với chymosin

2 là kháng huyết thanh thô với pepsin bò

3 là kháng huyết thanh thô với pepsin lợn

Ch là mẫu đối chứng của chymosin

Pp là mẫu đối chứng của pepsin lợn

Rpp là mẫu đối chứng của *Rhizomucor pusillus* protease

E<sub>1</sub> là mẫu phân tích (mẫu thử)

E<sub>3</sub> là mẫu phân tích (mẫu thử)

4 là kháng huyết thanh thô với *Rhizomucor miehei* protease

5 là kháng huyết thanh thô với *Rhizomucor pusillus* protease

6 là kháng huyết thanh thô với *Cryphonectria parasitica* protease

BP là mẫu đối chứng của pepsin bò

Rmp là mẫu đối chứng của *Rhizomucor miehei* protease

Cpp là mẫu đối chứng của *Cryphonectria parasitica* protease

E<sub>2</sub> là mẫu phân tích (mẫu thử)

**CHÚ THÍCH:** E<sub>1</sub>, E<sub>2</sub> và E<sub>3</sub> có thể là ba rennet khác nhau hoặc là một rennet ở ba độ pha loãng khác nhau, nghĩa là không pha loãng, pha loãng 20 lần và pha loãng 100 lần, tương ứng.

**Hình A.1 — Ví dụ về thiết lập phiên kính**

**A.5.3.2 Rửa và nhuộm màu các phiên đồ**

Mỗi phiên đồ được phủ một lớp giấy lọc và vài lớp (ví dụ 0,5 cm) giấy mềm hấp thụ trước đó đã được nén nhẹ (ví dụ: sử dụng để dưới chông sách) cho tối thiểu 10 min. Bỏ giấy ra. Ngâm phiên đồ này trong dung dịch natri clorua 9 g/l (A.5.1.1) hơn 1 h. Lặp lại quy trình nén trong 10 min. Rửa phiên đồ này trong dung dịch natri clorua 9 g/l qua đêm ở nhiệt độ phòng.

Nén phiên đồ đã chuẩn bị và ngâm trong nước cất trong 30 min. Lấy ra và nén rồi làm khô phiên đồ này trong không khí nóng.

Các lỗ gel trống được đổ đầy bằng nước cất để ngăn ngừa gel nứt trong khi nén. Tháo bỏ giấy lọc ra khỏi gel sau mỗi lần nén. Quy trình rửa có thể được sửa đổi bằng cách sử dụng thời gian dài hơn và có nén hoặc không nén gel hoặc rút ngắn thời gian rửa và nén gel thường xuyên hơn (xem thêm hướng dẫn của nhà cung cấp).

Ngâm phiên đồ đã chuẩn bị trong thuốc nhuộm (A.5.3.1) trên 15 min.

Làm mất màu phiến đồ trong dung môi của etanol, axit axetic và nước với các thể tích tương ứng 4,5 + 1,0 + 4,5 được sử dụng để chuẩn bị thuốc nhuộm (A.5.3.1). Sau khi làm mất màu, phiến đồ có thể được rửa sạch trong nước và sấy khô trong không khí nóng.

### A.6 Diễn giải kết quả

Các đường kết tủa có thể được ghi lại trực tiếp sau khi ủ là đường kết tủa màu trắng đục, nhưng kết tủa thường trở nên rõ hơn sau khi nhuộm.

Sự xuất hiện đường kết tủa, giữa giếng chứa các kháng thể với enzyme A và giếng chứa mẫu để phân tích E, cho thấy sự có mặt của enzyme A trong mẫu E. Kết tủa này cản tiếp tục xuất hiện giữa đường kết tủa đối với enzyme đối chứng và đường kết tủa đối với mẫu thử nghiệm (xem Hình A.2).



Hình A.2 – Ví dụ về các kết quả khuếch tán kép

Giải thích kết quả của phiến đồ như sau:

- Kết tủa giữa mỗi kháng huyết thanh và mẫu đối chứng tương ứng (xem A.5.2.2) cho thấy các hàm số thử nghiệm.
- Mẫu E<sub>1</sub> chứa chymosin (CH), pepsin bò (BpA) và *Rhizomucor miehei* protease (Rmp).
- Mẫu E<sub>2</sub> chỉ chứa *Rhizomucor miehei* protease (Rmp).
- Không có mẫu nào chứa pepsin lợn (PPA).
- Không có mẫu E<sub>3</sub> trên phiến kính này.

**A.7 Độ nhạy**

Độ nhạy của phương pháp thay đổi với các kháng huyết thanh được sử dụng, nhưng trong rennet chứa 200 IMCU/ml có mặt enzym tương ứng nhỏ hơn 5 % tổng số hoạt độ có thể dễ dàng phát hiện được trong hỗn hợp. Nói chung, giá trị ngưỡng 1 % của tổng số hoạt độ có thể đạt được.

**Phụ lục B**

(Tham khảo)

**Kết quả của phép thử liên phòng thử nghiệm****B.1 Yêu cầu chung**

Phép thử liên phòng thử nghiệm này gồm có 10 phòng thử nghiệm của sáu quốc gia tham gia, thực hiện trên các mẫu rennet bò. Phép thử liên phòng thử nghiệm này do A. Andrén (SE) tổ chức năm 1995, các thành viên tham gia bao gồm: C. Repelius (NL), J.-C. Collin (FR), T. Sørhaug (NO), J.A. Jans (NL), M. Rampilli (IT), M. Harboe (DK), A. van Boven (NL), M. Stolz (FR), P. Molinari (IT) và A.-K. Levin (SE). Các kết quả thử nghiệm đã được phân tích thống kê theo TCVN 6910-1 (ISO 5725-1)<sup>[3]</sup> và TCVN 6910-2 (ISO 5725-2)<sup>[4]</sup>.

**B.2 Mẫu thử và kết quả**

Nghiên cứu này được thực hiện sử dụng bốn mẻ khác nhau của rennet bò dạng lỏng, bao trùm các tỷ lệ hoạt độ chymosin thấp, trung bình và cao; các mức chymosin và pepsin tương ứng khác nhau. Bốn mẻ được chia thành tám mẫu mù kép (1/4, 2/3, 5/7 và 6/8).

Các kết quả thử nghiệm đã được phân tích thống kê lại và cập nhật năm 2010 theo TCVN 6910-1 (ISO 5725-1)<sup>[3]</sup> và TCVN 6910-2 (ISO 5725-2)<sup>[4]</sup>. Các kết quả được nêu trong Bảng B.1 đến B.3. Các kết quả ngoại lệ (Cochran: chênh lệch quá cao giữa các lần lặp lại; Grubbs: chênh lệch quá cao giữa các phòng thử nghiệm) đã được loại trừ sau phân tích thống kê. Phép thử liên phòng thử nghiệm trên các mẫu rennet cho kết quả tốt về độ lặp lại và độ tái lập, đặc biệt là khi kết quả được biểu thị bằng phần trăm hoạt độ chymosin (xem Bảng B.1).

**Bảng B.1 – Đánh giá thống kê tỷ lệ hoạt độ chymosin, tính bằng phần trăm từ 10 phòng thử nghiệm**

Mẫu	Trung bình %	$s_r$	$C_{V,r}$ %	$r$	$r_{rel}$ %	$s_R$	$C_{V,R}$ %	$R$	$R_{rel}$ %	Ngoại lệ
1/4	90,40	0,69	0,76	1,93	2,13	0,73	0,81	2,05	2,27	0
2/3	54,36	0,69	1,28	1,94	3,57	1,34	2,46	3,75	6,89	0
5/7	20,33	0,28	1,40	0,79	3,91	1,16	5,69	3,24	15,92	1 Cochran
6/8	72,55	0,94	1,29	2,62	3,61	1,41	1,94	3,94	5,43	1 Grubbs
Trung bình	–	<b>0,65</b>	1,18	<b>1,82</b>	3,31	<b>1,16</b>	2,72	<b>3,24</b>	7,63	–

**Bảng B.2 – Đánh giá thống kê hàm lượng chymosin, tính bằng miligam trên lit, thu được từ 10 phòng thử nghiệm**

Mẫu	Trung bình mg/l	$s_r$	$C_{V,r}$ %	$r$	$r_{rel}$ %	$s_R$	$C_{V,R}$ %	$R$	$R_{rel}$ %	Ngoại lệ
1/4	599,00	24,11	4,02	67,50	11,27	40,93	6,83	114,59	19,13	0
2/3	456,15	12,73	2,79	35,64	7,81	29,47	6,46	82,51	18,09	0
5/7	216,94	7,68	3,54	21,50	9,91	16,92	7,80	47,36	21,83	1 Cochran
6/8	513,78	21,47	4,18	60,10	11,70	32,60	6,35	91,29	17,77	1 Grubbs
Trung bình	–	16,50	<b>3,63</b>	46,19	10,17	29,98	<b>6,86</b>	83,94	19,20	–

**Bảng B.3 – Đánh giá thống kê hàm lượng pepsin, tính bằng miligam trên lit, thu được từ 10 phòng thử nghiệm**

Mẫu	Trung bình mg/l	$s_r$	$C_{V,r}$ %	$r$	$r_{rel}$ %	$s_R$	$C_{V,R}$ %	$R$	$R_{rel}$ %	Ngoại lệ
1/4	193,65	16,22	8,38	45,43	23,46	19,40	10,02	54,33	28,06	0
2/3	1 169,90	43,98	3,76	123,15	10,53	107,72	9,21	301,63	25,78	0
5/7	2 665,90	366,60	13,75	1 026,47	38,50	468,92	17,59	1 312,98	49,25	0
6/8	612,35	47,53	7,76	133,09	21,73	68,49	11,18	191,77	31,32	0
Trung bình	–	118,58	<b>8,41</b>	332,03	23,56	166,13	<b>12,00</b>	465,18	33,60	–



### Thư mục tài liệu tham khảo

- [1] TCVN 6400 (ISO 707), *Sữa và sản phẩm sữa – Hướng dẫn lấy mẫu*
- [2] TCVN 7153 (ISO 1042), *Dụng cụ thí nghiệm bằng thủy tinh – Bình định mức*
- [3] TCVN 6910-1 (ISO 5725-1), *Độ chính xác (độ đúng và độ chụm) của phương pháp đo và kết quả đo – Phần 1: Nguyên tắc và định nghĩa chung*
- [4] TCVN 6910-2 (ISO 5725-2), *Độ chính xác (độ đúng và độ chụm) của phương pháp đo và kết quả đo – Phần 2: Phương pháp cơ bản xác định độ lặp lại và độ tái lập của phương pháp đo tiêu chuẩn*
- [5] ANDRÉN, A., Rennets and coagulants. In: FUQUAY, J.W., FOX, P.F., MCSWEENEY, P. editors. *Encyclopedia of dairy sciences*, 2nd edition, pp. 574.–578. Elsevier, 2011
- [6] HARBOE, M., BROE, M.L., QVIST, K.B. The production, action and application of rennet and coagulants. In: LAW, B.A., TAMINE, A.Y., editors. *Technology of cheesemaking*, second edition, pp. 98.–129. Oxford: Wiley.–Blackwell, 2010
- [7] ANDRÉN, A. Milk-clotting activity of various rennets and coagulants: Background and information regarding IDF Standards. In: *The use of enzymes in dairying*, Document No. 332, pp. 9.–14. Brussels: International Dairy Federation, 1998
- [8] GARNOT, P., THAPON, J.L., MATHIEU, C.M., MAUBOIS, J.L., RIBADEAU-DUMAS, B. Determination of rennin and bovine pepsins in commercial rennets and abomasal juices. *J. Dairy Sci.* 1972, 55, pp. 1641.–1650.
- [9] COLLIN, J.C., MARTIN, P., GARNOT, P., RIBADEAU-DUMAS, B., MOCQUOT, G. Determination of chymosin and bovine pepsin A in commercial bovine rennets and pepsins. *Milchwissenschaft* 1981, 36, pp. 32.–35.
- [10] COLLIN, J.C., MUSET DE RETTA, G., MARTIN, P. Immunological identification of milk-clotting enzymes. *J. Dairy Res.* 1982, 49, pp. 221.–230.
- [11] International Collaborative Study on Calf Rennet and Adult Bovine Rennet. – Determination of Chymosin and Bovine Pepsin Contents . – Bull. IDF (in press).